

DOI: 10.5281/zenodo.3892953

CZU: 581.33

ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ СПОР *BACILLUS SUBTILIS* В СУХОЙ ПРЕПАРАТИВНОЙ ФОРМЕ ПРИ ДЛИТЕЛЬНОМ ХРАНЕНИИ ПРЕПАРАТА

Аркадий НИКОЛАЕВ, Ирина МАКСИМОВА, Светлана НИКОЛАЕВА

Abstract. The purpose of the research is to create a dry preparative form of a microbiological product that allows producing and storing the preparation for a long time. The objective of the study is to determine the viability of spores in the preparation over various periods of preparation storage. To determine the spore titer, colonies were counted using digital images when sowing various dilutions in samples on the nutritive medium. The article presents data on the viability of *Bacillus subtilis* spores in a dry preparation, depending on the shelf life of the fungicide. The titer of viable spores in the initial preparation was $9.1 \cdot 10^9$ spores per gram, after 5 months of storage - $8.6 \cdot 10^9$ spores / 1g, after 36 months - $5.7 \cdot 10^9$ spores / 1g, after 72 months - $2.7 \cdot 10^9$ spores / 1g. After 6 years storage of the dry preparative form, the titer of viable spores was comparable with the liquid form of the fungicide currently used and not storable for a long time.

Key words: Bacterial preparation; Dry formulation; Shelf life; Spore viability.

Реферат. Цель исследований – создать сухую препаративную форму микро-биопрепарата, позволяющую нарабатывать и хранить препарат длительное время. Задача исследований – определить жизнеспособность спор в препарате через различные сроки хранения препарата. Для определения титра спор проводился учет колоний по цифровым изображениям при посеве различных разведений в навесках препарата. В статье приводятся данные о жизнеспособности спор *Bacillus subtilis* в сухом препарате в зависимости от сроков его хранения. Титр жизнеспособных спор исходного препарата составлял $9,1 \cdot 10^9$ спор в 1 грамме. После 5 месяцев хранения титр составлял $8,6 \cdot 10^9$ спор/г, после 36 месяцев – $5,7 \cdot 10^9$ спор/г, после 72 месяцев – $2,7 \cdot 10^9$ спор/г. После 6 лет хранения препарата титр жизнеспособных спор был сопоставим с таковым в жидкой форме препарата, применяемой в настоящее время и не подлежащей длительному хранению.

Ключевые слова: Бактериальный препарат; Сухая препаративная форма; Сроки хранения; Жизнеспособность спор.

ВВЕДЕНИЕ

Биологические препараты на основе *Bacillus subtilis* в последнее время находят все большее применение для борьбы с болезнями растений. Споровые бактерии, и в частности бактерии рода *Bacillus*, уже давно привлекают внимание ученых как источники различных микробиологических продуктов.

Korsten L., Cook N. (1996) приводят информацию о применении *Bacillus cereus* против ржавчины лука, *Bacillus megaterium* – против стеблевой ржавчины пшеницы, антракноза джута, бурой пятнистости риса; *Bacillus mycoides*, *Bacillus polymyxa* и *Bacillus pumilis* – против стеблевой ржавчины пшеницы, и, в особенности, *Bacillus subtilis* в качестве средств защиты растений от разных болезней.

Антибиотики, образуемые споровыми бактериями рода *Bacillus*, широко используются в медицине (Кожибски, Т. и др. 1969) животноводстве, в качестве пробиотиков для регулирования баланса микрофлоры кишечника в медицинских и ветеринарных целях (Senesi, S. 2004; Hong, H.A. и др. 2005), а также в качестве источников получения ферментов и т.п.

Работа по применению биологического метода борьбы с болезнями растений заставляет ученых постоянно вести исследования по разработке препаративных форм биопрепаратов (Jae Pil Lee, Seon-Woo Lee и др. 2006; Salam, N. et al. 2009).

В республике Молдова отсутствует крупнотоннажное производство микро-биопрепаратов, поэтому биопрепараты производят с помощью подвесных качалок инженерно-технологического института «Биотехника» Национальной Академии Аграрных Наук Украины. Продукты, полученные на таком оборудовании, представляют собой жидкую культуру микроорганизма-продуцента. В качестве производственного биопрепарата применяют именно такую форму препарата. Как правило, такие формы препаратов не могут храниться длительное время, что создает определенные трудности и для разработчиков биопрепаратов, и для потребителей. Как правило, такие препараты потребитель приобретает после выполнения производителем специального заказа. Поэтому успешное применение биопрепаратов предусматривает создание препаративной фор-

мы, которая не теряла бы биологическую активность в процессе хранения. Наличие стабильной, длительно хранящейся формы биопрепаратов позволяет хорошо организовать наработку препарата, его применение и реализацию.

Цель наших исследований – разработка сухой препаративной формы препарата, которая может храниться длительное время без потери активности.

Задача исследований – определить продолжительность сохранности жизнеспособных спор в созданной нами опытной партии препарата, при которой титр препарата оставался бы близким к исходному.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В 2014 году мы получили опытную партию сухого препарата спор спорных бактерий *Bacillus subtilis*. При получении сухой препаративной формы биопрепарата на основе спор руководствовались методом, описанным в патенте Леляк А.И. и др. (Патент RU 2105562). Примененный нами метод отличается от патента тем, что споры бактерий получали не на плотной, а на жидкой среде.

Технология получения сухой препаративной формы, которую мы применили, включает такие стадии:

- выращивание бактерии-продуцента в жидкой питательной среде до стадии максимального спорообразования;
- отделение биомассы спор от питательной среды;
- адсорбция спор на смеси крахмала и сахарной пудры и при необходимости последующее добавление сахарной пудры до создания сыпучего состояния препарата.

В качестве наполнителя использовали смесь сахара и крахмала при соотношении биомассы спор бактерий и крахмала не более 1:1 и биомассы спор бактерий и сахара не более 1:50. При увеличении соотношения спор бактерий и крахмала более 1:1 не все споры будут иммобилизованы на крахмал, что снизит качество приготавливаемого препарата. В результате нескольких проб был найден приемлемый способ и приготовлена опытная партия сухого порошка препарата.

Препарат из споровой фракции готовили следующим образом:

Отцентрифугировали в пробирку споры из 200 мл 30 часовой жидкой культуры *B. subtilis* CNMN-BB-06 на оптимизированной среде и осторожно слили надосадочную жидкость. Следует отметить, что над осадком было некоторое количество жидкости не свободной от взвеси. При попытке слить надосадочную жидкость часть взвеси также могла быть слита. Мы предполагаем, что таким образом могла произойти потеря какого-то количества спор, поэтому старались сливать надосадочную жидкость таким образом, чтобы не допустить существенной потери взвеси и, как следствие, спор бактерий. Поэтому осадок спор содержал небольшое (минимальное) количество жидкой фракции. После этого в пробирку добавили 5 г смеси сахар: крахмал (1:1) и перемешали до максимальной гомогенности. Получилась паста, тягучая и довольно влажная. Поэтому к этой смеси добавили еще 5 г такой же смеси и снова тщательно перемешали. Пастообразное состояние сохранилось. Поэтому еще в два этапа добавляли по 5 г чистого сахара. В итоге получился влажный порошок.

Через определенные промежутки времени хранения из образца препарата были собраны навески проб и определено количество живых спор в препарате. При определении титров применялся способ отсроченного учета числа колоний на чашках Петри с использованием цифровых изображений (Николаев, А., Николаева, С. 2015; Nikolaev A.N., Maksimova, I.A., Nikolaeva, S.I. 2016).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

Таким образом препарат спор содержал осадок спор из 200 мл жидкой культуры + 10 г смеси сахар: крахмал (1:1) и 10 грамм чистого сахара.

Из посевов аликвоты объемом 0,1 мл с учетом соответствующего разведения и перерасчета навески было установлено, что титр препарата составил $9,1 \cdot 10^9$ спор в 1 грамме препарата. Полученный сухой препарат спор был перенесен в пластиковый флакон с завинчивающейся крышкой и хранился при комнатной температуре в условиях лаборатории с 11.09.2014 года, (Николаев А.Н., Николаева С.И., 2017). При определении титра спор 24 февраля 2015 года, т.е. после 5 месяцев хранения, было установлено, что титр препарата составил $8,6 \cdot 10^9$ спор/г.

Через три года (август 2017 года) была снова определена жизнеспособность спор в этом же препарате и, было установлено, что титр составил $5,7 \cdot 10^9$ спор в 1 г препарата. И наконец, в марте 2020 года, т.е. после 6 лет хранения было снова определено количество спор в образце. Отличительной особенностью определения титров в опыте 2020 года было то, что посеы проб из разведения препарата проводили не с помощью шпателя Дригальского, а методом глубинного посева. При этом аликвоту разведений препарата в виде суспензии наносили на дно пустой стерильной чашки Петри, после чего чашка заливалась расплавленной агаризованной средой, и проводились круговые вращения для равномерного распределения спор в еще не остывшей среде.

На рисунке 1 показаны чашки с колониями глубинного посева спор в разведении 10^6 при учете 19 марта 2020. На чашке слева выросло 212 колонии, а на чашке справа – 204 колонии. Среднее из двух чашек число колоний на чашу составило 208 колоний.

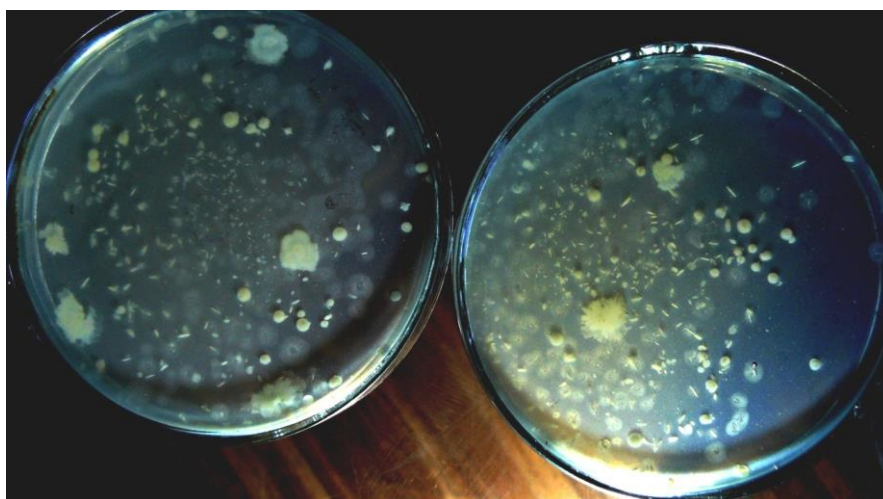


Рисунок 1. Глубинные колонии на чашках с разведением 10^6 при раститровке биопрепарата 19 марта 2020

Расчет титра в препарате показал, что в 1 г препарата на дату учета титр составил $2,7 \cdot 10^9$ спор в 1 грамме препарата. В таблице 1 приводятся титры препарата в зависимости от продолжительности срока хранения.

Таблица 1. Динамика снижения жизнеспособности спор в сухой препаративной форме биопрепарата на основе *B. subtilis* в зависимости от продолжительности хранения препарата

№ п/п	Продолжительность хранения препарата	Титр препарата и срок хранения препарата
1	исходный титр	$9,1 \cdot 10^9$ спор/г
2	5 месяцев	$8,6 \cdot 10^9$ спор/г
3	36 месяцев	$5,7 \cdot 10^9$ спор/г
4	72 месяца	$2,7 \cdot 10^9$ спор/г

Из таблицы видно, что за период хранения препарата в течение шести лет титр спор в препарате уменьшился более чем в три раза, но в тоже время оставался таким же или даже выше, чем жидкий препарат, получаемый биофабриками на подвесных качалках.

Препарат, полученный по использованной нами технологии, хорошо диспергируется в рабочем растворе и не образует комков при хранении. Наличие крахмала и сахара в препарате после обработки растений создает резерв питания для прорастания спор на поверхности растений и повышает эффективность действия препарата. Такой препарат можно применять для предпосевной обработки семян, для внесения в почву и для опрыскивания растений. По такой технологии можно получать пробиотики для использования в медицине и в животноводстве, потому что кроме действующего начала, препарат содержит экологически чистые и безопасные для здоровья человека и животных крахмал и сахар.

ВЫВОДЫ

Результаты исследований показывают, что полученная нами препаративная форма сухого препарата позволяет нарабатывать впрок препарат и хранить его без риска существенной потери жизнеспособности спор в течение шести лет. После шести лет хранения жизнеспособность спор в препарате уменьшилась с $9,1 \cdot 10^9$ спор/г до $2,7 \cdot 10^9$ спор/г.

Это позволяет заранее в межсезонье наработать необходимое количество препарата для проведения работ в течение вегетационного периода, не отвлекаясь на работу, связанную с получением препарата.

Препараты, полученные по такой технологии, являются высокотехнологичными при применении, экологически чистыми и пригодными для различных способов применения (предпосевной обработки, внесения в почву, опрыскивания растений). Такие препараты могут применяться в защите растений, медицине и ветеринарии.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. КОЖИБСКИ, Т., КОВШИК-ГИНДИФЕР, З., КУРЫЛОВИЧ, В. (1969). Антибиотики, происхождение, природа и свойства. Варшава: Польское государственное медицинское издательство. 1343 с.
2. ЛЕЛЯК, А.И., КОСТРОВСКИЙ, В.Г. РЯЗАНКИНА, О.И., НАБИЕВ, К.Ф. МИСТЮРИН, Ю.Н., НОЗДРИН, Г.А. Способ получения бактериального препарата на основе *Bacillus subtilis* (Патент RU № 2105562).
3. НИКОЛАЕВ, Аркадий, НИКОЛАЕВА, Светлана, МАКСИМОВА, Ирина. (2015). Способ отсроченного учета числа колоний на чашках Петри. In: Studia Universitatis Moldaviae, Seria Științe reale și ale naturii, nr. 1(81), pp. 17-21. ISSN 1857-498X.
4. НИКОЛАЕВ, А.Н., НИКОЛАЕВА, С.И. (2017). Опыт создания сухой препаративной формы биопрепарата на основе *Bacillus subtilis*. В: Actual problems of zoology and parasitology: achievements and prospects: intern. symp., Chisinau, 3 Oct. 2017, с. 265-269. ISBN 978-9975-66-590-2.
5. HONG, H.A., LE DUC, H., CUTTING, S.M. (2005). The use of bacterial spore formers as probiotics. In: FEMS microbiology reviews, vol. 29, pp. 813-835. ISSN 1574-6976.
6. JAE PIL LEE, SEON-WOO LEE et al. (2006). Evaluation of formulations of *Bacillus licheniformis* for the biological control of tomato gray mold caused by *Botrytis cinerea*. In: Biological Control, vol. 37, pp. 329-337. ISSN 1049-9644.
7. KORSTEN, L., COOK, N. (1996). Optimizing Culturing Conditions for *Bacillus subtilis*. In: South African Avocado Growers' Association yearbook, vol. 19, pp. 54-58.
8. NIKOLAEV, A.N., MAKSIMOVA, I.A., NIKOLAEVA, S.I. (2016). The use of digital imaging in quantitative microbial counts. In: Intern. Sci. Conf. on Microbial Biotechnology. 3rd ed., Chișinău, 12-13 oct., p. 148.
9. SALAM N., ABD ELRAZIK, A.A., HASSAN, M., KOCH, E. (2009). Powder formulation of *Bacillus subtilis*, *Trichoderma spp* and *Coniothyrium minitans* for biocontrol of Onion White Rot. In: Archives of Phytopathology and Plant Protection, vol. 42(2), pp. 142-147. ISSN 0323-5408.
10. SENESI, S. (2004). *Bacillus* spores as probiotics products for human. In: RICCA, E., HENRIQUES, A.O., CUTTING, S.M. (eds.). Bacterial spore formers: probiotics and emerging applications. London, pp. 132-141. ISBN 978-190493-302-1.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

НИКОЛАЕВ Аркадий Николаевич*  <https://orcid.org/0000-0003-3948-7998>

доктор биологических наук, доцент, старший научный сотрудник, Лаборатория фитопатологии и биотехнологии, Институт Генетики, Физиологии и Защиты растений, Республика Молдова
E-mail: arcadiinicolaev2@gmail.com

МАКСИМОВА Ирина Аркадьевна  <https://orcid.org/0000-0003-3030-6417>

кандидат биологических наук, Факультет почвоведения, Московский Государственный Университет им. «М.В. Ломоносова», научный сотрудник, Лаборатория микробиологии почв, Россия
E-mail: maximova.irina@gmail.com

НИКОЛАЕВА Светлана Ивановна

доктор биологических наук, старший научный сотрудник, Лаборатория фитопатологии и биотехнологии, Институт Генетики, Физиологии и Защиты растений, Республика Молдова

*Corresponding author: arcadiinicolaev2@gmail.com

Received: 01.04.2020

Accepted: 15.05.2020